

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) **EP 0 742 286 A2**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
13.11.1996 Patentblatt 1996/46

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12Q 1/68**

(21) Anmeldenummer: **96107141.2**

(22) Anmeldetag: **07.05.1996**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**DE ES FR GB IT**

(30) Priorität: **08.05.1995 DE 19516196**

(71) Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**  
**68298 Mannheim (DE)**

(72) Erfinder:  
• **Doppler, Clemens, Dr.**  
**68782 Brühl (DE)**

- **Fritton, Hans-Peter, Dr.**  
**69509 Mörlenbach (DE)**
- **Hinzpeter, Mathias, Dr.**  
**80689 München (DE)**
- **Leying, Hermann, Dr.**  
**83673 Bichl (DE)**
- **Wittor, Helko**  
**82327 Tutzing (DE)**

(54) **Verfahren zum quantitativen Nachweis von Nukleinsäuren**

(57) Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von spezifischen Polynukleotidsequenzen, das im wesentlichen dadurch gekennzeichnet ist, daß eine aus einer Mischung, wie z.B. einer biologischen Probe isolierte einzelsträngige Nukleinsäure, insbesondere mRNA, in Lösung mit einer im wesentlichen zur zu bestimmenden Sequenz komplementären Polynukleotid-Sequenz hybridisiert, anschließend an eine Festphase immobilisiert und die Menge an gebundenem Hybrid bestimmt wird. Als besonders geeignet hat sich erwiesen, wenn die Bindung an die beschichtete Festplatte mittels einer spezifisch bindbaren chemischen Gruppe über eine Linkerfunktion gekoppelt an die zu bestimmende Sequenz oder die Polynukleotid-Sonden-Sequenz erfolgt.

**EP 0 742 286 A2**

## Beschreibung

Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von spezifischen Polynukleotid-Sequenzen, das im wesentlichen dadurch gekennzeichnet ist, daß eine aus einer Mischung, wie z.B. einer biologischen Probe isolierte einzelsträngige Nukleinsäure, insbesondere mRNA, in Lösung mit einer im wesentlichen zur zu bestimmenden Sequenz komplementären Polynukleotid-Sequenz hybridisiert, anschließend an eine Festphase immobilisiert und die Menge an gebundenem Hybrid bestimmt wird. Als besonders geeignet hat sich erwiesen, wenn die Bindung an die beschichtete Festphase mittels einer spezifisch bindbaren chemischen Gruppe gekoppelt an die zu bestimmende Sequenz oder die Polynukleotid-Sonden-Sequenz erfolgt.

Eine Reihe von Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren sind heute bekannt. Diese beruhen in der Regel auf dem Prinzip der Hybridisierung, wobei in den meisten Fällen zunächst die Immobilisierung der zu bestimmenden Sequenz an die Festphase erfolgt und anschließend eine markierte Nukleinsäure-Probe zugegeben wird. Das Verfahren ist jedoch zeitaufwendig und für den ungeübten Praktiker nicht ohne weiteres mit Erfolg durchzuführen. Dies gilt insbesondere deshalb, da eine Hybridisierung an der Festphase wenig effizient verläuft.

Alternativ kann die Bestimmung von Nukleinsäuren über die in situ-Markierung der Proben-Nukleinsäure und die Fixierung an die Festphase, vermittelt über eine sequenzspezifische Nukleotidsequenz-Probe, erfolgen. In einem weiteren Verfahren werden zwei sequenzspezifische Proben für die zu bestimmende Nukleinsäure herangezogen. Sowohl die in situ-Markierung, als auch die Hybridisierung mit zwei Proben an der Festphase verlaufen oft nicht reproduzierbar, d.h. sind schwer oder nur mit großer Ungenauigkeit quantifizierbar, sind dazu experimentell aufwendig und somit für die Routine der klinischen Diagnostik wenig geeignet. Entsprechende Verfahren bzw. Varianten sind als Northern-Blot-Verfahren, Nuclease-Protection-Assay und quantitative RT-PCR-Verfahren bekannt und gehören heute zu den Standardmethoden zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989); R. E. Farrell, *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, Academic Press; J. W. Larrick, *Trends Biotechnol.* **10**, 146-152 (1992); E. S. Kawasaki, *A Guide to Methods and Applications* (eds. Innis, M.A. et al) Academic Press).

Außerdem ist der Nachweis von Nukleinsäuren, insbesondere von mRNA im sogenannten Mikrotiterplatten-Verfahren bekannt, wobei die Hybridisierungsreaktion in Lösung erfolgt. In der Regel erfolgt dabei die Hybridisierung mit einer Biotin-markierten cDNA-Probe. Die Nukleinsäurehybride werden anschließend über die Biotin-Markierung immobilisiert und mit einem Antikörper, der spezifisch DNA/RNA-Hybride bindet in einem herkömmlichen ELISA-Verfahren detektiert (C. O. Yehle et al., *Mol. Cell. Probes* **1**, 177-193 (1987); F. Countlee et al., *J. Biol. Chem.* **256**, 11601-11604 (1990); EP 0 336 454). Ferner ist es möglich anstatt eines Antikörpers eine geeignete Detektionsprobe zu verwenden (sogen. Sandwichhybridisierung, EP 0 192 168).

Nachteilig bei Verfahren dieser Art ist jedoch zum einen, daß lediglich DNA als Fangprobe verwendet werden kann und zwar bedingt durch die Tatsache, daß der Nachweis über DNA/RNA-spezifische Antikörper erfolgt. Zum anderen ist das System unter Verwendung von herkömmlichen chromogenen Substraten nur wenig sensitiv. Darüber hinaus hat sich bei der Verwendung von photoreaktiven Substanzen als Markierungsreagenz für Nukleinsäureproben gezeigt, daß die Sensitivität unzureichend ist und die Handhabbarkeit entsprechender Bestimmungsverfahren zu wünschen übrig läßt (EP 0 237 833).

Auch ein erst kürzlich publiziertes Verfahren, bei dem RNA zunächst mit einer bereits im Mikrotiterplatten-well immobilisierten Fangprobe hybridisiert und anschließend mit einem fluoreszierenden interkalierenden Agens markiert und detektiert wird (T. Okamoto et al., *Anal. Biochem.* **221**, 202-204 (1994)), überkommt die Nachteile nur zum Teil. In Abhängigkeit von der Länge der Fangprobe führt dieses Verfahren zu hohem Hintergrundsignalen, da nicht nur die eigentlich nachzuweisende RNA, sondern auch die immobilisierte Fangprobe markiert wird.

Aufgabe der zugrundeliegenden Erfindung ist daher, ein Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen Polynukleotidsequenz zur Verfügung zu stellen, durch das die Nachteile der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren überwunden werden, d.h. das insbesondere leicht durchführbar und automatisierbar ist und mit dem Nukleinsäuren quantitativ erfaßt werden können.

Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen Polynukleotidsequenz in einer Probenmischung, welches folgende Schritte umfaßt: Die Nukleinsäuren, insbesondere solche mit Poly-dA-Sequenzen (mRNA) werden isoliert und, soweit noch erforderlich, in einzelsträngige Nukleinsäuren überführt.

Anschließend erfolgt die Markierung der zu bestimmenden einzelsträngigen Nukleinsäure mit einer chemischen Gruppe, die vorzugsweise über eine Linkerfunktion an das Nukleinsäuremolekül, vorteilhafterweise in nicht-kovalenter gebunden ist bzw. assoziiert ist. Als chemische Gruppen sind solche geeignet, durch die entweder die Bindung an die Festphase vermittelt wird, oder die in einem direkten oder indirekten Verfahren detektierbar sind. Als immobilisierbare chemische Gruppen haben sich spezifisch bindbare Liganden wie z.B. Biotin oder Haptene wie z.B. Digoxigenin als vorteilhaft erwiesen.

Die markierte Nukleinsäure wird dann mit einer Polynukleotid-Sonde, die mindestens eine einzelsträngige Basensequenz umfaßt, die im wesentlichen komplementär zu der zu bestimmenden Sequenz ist, in Lösung unter Bedingungen, die für eine Hybridisierung zwischen der zu bestimmenden Sequenz und der komplementären Sondensequenz

günstig sind, hybridisiert. Die Sondensequenz ist mit einer zweiten, von der ersten unterschiedlichen chemischen Gruppe markiert. Hier kommen prinzipiell wie oben immobilisierbare oder bestimmbar chemische Gruppen in Betracht mit der Maßgabe, daß die erste und zweite Gruppe nicht identisch sein dürfen.

Das zweifach markierte Nukleinsäurehybrid wird über eine Markierungsgruppe an die Festphase gebunden, und über die andere wird die Menge an gebundenem Hybrid und somit die aus einem bestimmten Volumen isolierte Nukleinsäure quantifiziert.

Insbesondere als vorteilhaft hat sich das erfindungsgemäße Verfahren für die Quantifizierung von Poly-dA-Sequenzen beinhalten Nukleinsäuren wie mRNA erwiesen. Zur Hybridisierung können alle Arten von Proben verwendet werden, insbesondere anti-sense RNA und sogenannte "Peptide Nucleic Acid" (PNA). Dies ist von Bedeutung, da die Hybridisierung zwischen PNA- und RNA-Molekülen effizienter erfolgt als zwischen reinem RNA-Molekülen und diese wiederum effizienter hybridisieren als DNA- und RNA-Moleküle.

Der Einbau einer großen Anzahl von Markierungen in die nachzuweisenden RNA oder in die zum Nachweis benutzte DNA erlaubt eine Erhöhung des Meßsignals und damit insbesondere auch den chromogenen Nachweis von spezifischer mRNA, was bei den vorbekannten Verfahren nur bedingt möglich ist.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die zur Immobilisierung eingesetzte Probe nicht markiert wird. Dies führt zu einer erheblichen Reduktion des Hintergrundes.

Zudem ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren von Vorteil, daß die Hybridisierungsreaktion nicht an der Festphase, sondern in Lösung erfolgt. Hybridisierungen in Lösung erfolgen effizienter und erheblich schneller.

Neben den bereits angeführten chemischen Gruppen für die Markierung sind zudem, als bestimmbar Gruppen, enzymatisch aktive Gruppen wie beispielsweise Peroxidase oder  $\beta$ -Galactosidase, fluoreszierende Gruppen wie Fluorescein oder entsprechende Derivate, Chromophore verschiedenster Art oder lumineszierende Gruppen geeignet. Diese chemischen Gruppen können auf chemischem oder enzymatischem Weg in die Nukleinsäure eingebaut werden. Aber auch Radioisotope, beispielsweise eingebaut in Gegenwart einer terminalen Transferase bzw. T4 RNA-Ligase und eines entsprechend markierten Nukleotids bzw. Oligonukleotids, haben sich als geeignet erwiesen.

Außerdem kann ein Verfahren zum Einführen von nicht-radioaktiv markiertem Desoxynukleotiden in Nukleinsäuren bzw. RNA-Molekülen, die an ihrem 3'-Ende mindestens ein Desoxynukleotid enthalten, das eine nicht-radioaktive Markierungsgruppe trägt, verwendet werden. Ein entsprechendes Verfahren ist in der europäischen Patentanmeldung, Aktenzeichen 95 102 669.9, beschrieben.

Als besonders vorteilhaft hat sich erwiesen, wenn die Markierung der Nukleinsäure bzw. des Polynukleotids mit einem entsprechendem Hapten, wie beispielsweise Biotin oder Digoxigenin, komplexiert in eine Platin-enthaltende Verbindung, wie beispielsweise  $\text{Pt}(\text{ethyldiamin})(\text{Me}_2\text{SO})(\text{hapten-NH}(\text{CS})\text{NHCH}_3)$ , durchgeführt wird. Für die Markierung wird eine entsprechend aktivierte Form solcher Platin-Komplexe verwendet. Solche Platin-Verbindungen haben sich als Linkerfunktion als besonders geeignet erwiesen und werden üblicherweise als "Universal Linkage System" (ULS) bezeichnet (EP 0 539 466 / WO 92/01699). Als detektierbare, d.h. als zweite chemische Gruppe haben sich insbesondere Platin-Komplex gekoppelte Gruppen als vorteilhaft erwiesen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist, wenn anstatt einer markierten, komplementären Polynukleotid-Sonde ein Peptid-Nukleinsäure-Derivat mit im wesentlichen zur bestimmenden Sequenz komplementären Basensequenz verwendet wird.

Die Festphase kann prinzipiell aus einer Reihe von Materialien und Formen bestehen, wie z.B. Mikropartikel, sogenannte Beads, porenhaltige oder nicht-permeable Membranen, der inneren Oberflächen von Reaktionsgefäßen wie Teströhrchen oder Mikrotiterplatten. Bevorzugt wird die vorliegende Erfindung an beschichteten Mikrotiterplatten (z.B. Nunclon) durchgeführt, insbesondere solche, bei denen die Beschichtung mit Streptavidin (SA) oder Avidin vorgenommen wurden. Entsprechende Maßnahmen bzw. Festphasen sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in EP 0344578 beschrieben.

Im folgenden werden die einzelnen Verfahrensschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens genauer beschrieben:

Die Isolierung von ca. 10 - 20  $\mu\text{g}$  mRNA erfolgt über geeignete Beads entsprechend den Informationen zu dem mRNA-Isolierungskit von Boehringer Mannheim. Die Quantifizierung erfolgt bei  $\text{OD}_{260/280\text{nm}}$ , wobei 2  $\mu\text{g}$  mRNA in 500  $\mu\text{l}$  wässrige Lösung 0,1  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  entsprechen.

Für die Markierung von ca. 10  $\mu\text{g}$  mRNA werden ca. 0,4  $\mu\text{g}$  Biotin-ULS zugegeben und ca. 60 Minuten bei 65°C inkubiert, anschließend mit Ethanol gefüllt und über  $\text{OD}_{260/280\text{nm}}$  quantifiziert.

Für die Hybridisierung werden ca. 100-150  $\mu\text{l}$ /well in einem geeigneten Hybridisierungspuffer vorgelegt und auf ca. 50°C vorgeheizt. Eine DIG-markierte DNA-Probe wird in denaturierter Form zum jeweiligen Reaktionsansatz gegeben, nachdem ca. 50 bis 1000 ng/well der Biotin-markierten mRNA einpipettiert wurden. Als besonders vorteilhafter Hybridisierungspuffer hat sich beispielsweise eine wässrige Lösung erwiesen, die ca. 50% Formamid, 0,1% Laurysarcosin und 0,02% SDS enthält. Die Hybridisierung erfolgt in der Regel zwischen 30 Minuten bis 4 Stunden - die Dauer der Hybridisierung hängt z.B. von der Länge der spezifischen Probesequenz als auch von der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen ab - bei ca. 50°C bei 400 rpm. Diese Hybridisierungsbedingungen haben sich überraschenderweise für den spezifischen Nachweis von RNA als gut geeignet erwiesen. Dies ist deshalb überraschend, da auf der einen

Seite zwar die erforderliche Stringenz gewährleistet wird, auf der anderen Seite jedoch eine rasche Denaturierung von Protein, wie z.B. einer proteinartigen Beschichtung zu erwarten gewesen wäre.

Von dem Hybridisierungsansatz werden ca. je 100 µl in auf 50°C vorgeheizte SA-beschichtete Mikrotiterplattenwells pipettiert. Die Inkubation erfolgt bei 50°C/400 rpm in ca. 5 Minuten.

- 5     Anschließend wird dekantiert und 3 bis 6 mal bei Raumtemperatur gewaschen. Die anschließende Inkubation mit beispielsweise POD-markiertem DIG-Antikörper erfolgt in 30 Minuten bei 37°C und 400 rpm. Die anschließende Detektion erfolgt beispielsweise durch Einpipettieren von Luminol/Iodphenol und Messung nach ca. 3 Minuten.

Erläuterungen zu den Abbildungen:

- 10     Abbildung 1: Zeigt das Ergebnis von Beispiel 1-4, wobei ○ = β-Actin, ein Gen, welches permanent in Zellen vorkommt, und □ = CAT, ein Gen, welches nicht in eukaryotischen Zellen vorkommt bedeutet; gefüllte Symbole bedeutet "transfiziert".

- 15     Abbildung 2: Zeigt den Einfluß der Ampliconkonzentration, wobei ○ = 0,5 µl, □ = 1 µl, Δ = 2 µl, ▽ = 5 µl und ◇ = 10 µl PCR-Fragment pro well bedeuten.

Abbildung 3: Zeigt den Einfluß der Amplifconkonzentration bei konstanter RNA-Konzentration (○ = 1000 ng, □ = 500 ng, Δ = 250 ng, ▽ = 125 ng und ◇ = 62 ng Biotin (Bi)-mRNA/well).

- 20     Abbildung 4: Zeigt den Einfluß der Hybridisierungstemperatur, ○ = 50°C und □ = 37°C.

Abbildung 5: Zeigt den Einfluß der Formamid-Konzentration, ○ = 50% Formamid und □ = 10% Formamid.

- 25     Abbildung 6: Zeigt einen Vergleich zwischen dem erfindungsgemäßen Northern ELISA- und dem Northern Blot-Verfahren nach dem Stand der Technik, wobei mRNA aus 1 x 562 25:1 BioULS gelabelt ist und die Hybridisierung mit DIG-β-Actin PCR-Fragment (838 bp) bzw. CAT-Fragment durchgeführt wurde; ○ = β-Actin, □ = CAT.

Abbildung 7: Reaktionsschema des erfindungsgemäßen Verfahrens (Northern ELISA).

- 30     Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Gesamt mRNA wird über Biotin-Platinkomplexe (Bio-ULS®) mit Biotin markiert. Der Ansatz wird anschließend mit einer für ein Transkript-spezifischen, Digoxigenin (DIG) gelabelten DNA/RNA-Probe hybridisiert. Nach Bindung der mRNAs in einer Streptavidin (SA)-beschichteten Mikrotiterplatte MTP wird die spezifische RNA über DIGPOD detektiert.

- 35     In diesem Bericht wird die Messung von Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-spezifischer mRNA aus mit CAT-Plasmid transfizierten Zellen beschrieben.

#### Material und Methoden

- 40     Plasmid pSV2CAT wurde erhalten von Dr. Kösters (Universitätsspital Zürich). DNA DIPSTICKS® zur Quantifizierung der mRNA stammen von Invitrogen (USA). Bio-ULS® stammt von Kreatech (Holland). Reagenzien wie Northern Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5 x SSC, 12% Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer, 0,1% Laurylsarcosin, 0,02% SDS), mRNA Isolierungskit, Zellkulturmedien und Transfektionsreagenzien, Reagenzien zur Herstellung der DNA Probes, Streptavidin beschichtete MTP, DIGPOD, RNase-freier Konjugatverdünnungspuffer (40 mM KPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0,25% RSA, pH 6,8) Luminol/Iodphenol als Chemilumineszenzsubstrat und weitere Reagenzien stammen von Boehringer Mannheim. Chemilumineszenzmessungen wurden mit dem Microplate Luminometer LP 96P von Berthold durchgeführt.

#### Beispiel 1

50

#### Herstellung der DIG gelabelten Probes

- Methoden zur Herstellung geeigneter Probes sind zum Beispiel Amplifikation über PCR, Random Primed Labeling und in vitro Transkription. Die hier verwendeten Probes wurden über geeignete Primer, die innerhalb der codierenden Sequenz der Target-RNA liegen, mittels PCR amplifiziert. Probe-Länge für Actin-Probe: 838 bp; für CAT-Probe: 367 bp (molares Verhältnis im PCR-Mix: dUTP/DIG-dUTP = 3/1). Über Ethidiumbromidfärbung wurde die Ampliconkonzentration abgeschätzt und mit Triethanolamin (TE) pH 8.0 auf ca. 20ng/µl eingestellt.

Beispiel 2**Transfektionsansatz**

Hela Zellen wurden mittels DOTAP nach Beipackzettel mit pSV2CAT transfiziert. Von den transfizierten Zellen und den unbehandelten Kontrollen wurde die mRNA mittels magnetic beads isoliert.

5 Kulturflaschen mit je  $5 \times 10^6$  Zellen/Flaschen (50 ml KM) wurden mit insgesamt 400 µg Plasmid während 6 Stunden transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen abgetrypsiniert, mit PBS gewaschen und das Pellet in flüssigem Stickstoff gelagert ( $4,4 \times 10^6$  lebende Zellen, 80% tote Zellen). Analog wurde mit der nicht transfizierten Kontrolle verfahren ( $1,3 \times 10^7$  lebende Zellen, 5% tote Zellen).

Beispiel 3**mRNA Isolierung und Markierung mit Biotin**

Die mRNA wurde mittels magnet beads laut Beipackzettel aufgereinigt und die Konzentration über DNA DIPSTICK® bestimmt: Hela (+CAT):

10 µl mit  $c=360$  ng/µl, Hela (-CAT): 23 µl mit  $c=500$  ng/µl. Dann wurde mit Biotin-ULS im Verhältnis RNA/Bio-ULS = 20/(W/W) 1 Stunde bei 65°C gelabelt, über Ethanolfällung aufgereinigt und in Wasser resuspendiert. Anschließende Konzentrationsbestimmung über DNA DIPSTICKS® ergab: Hela (+CAT): 9 µl mit 200 ng/µl, Hela (-CAT): 29 µl mit 80 ng/µl.

Beispiel 4**Durchführung Northern ELISA**

In eine Zellkultur Rundbodenplatte wurden je 120 µl Northern Hybridisierungspuffer pipettiert und auf 50°C erwärmt. Die DIG markierten Probes aus Beispiel 1 wurden 5 min bei 100°C denaturiert und dann im Eisbad gekühlt. Zu dem Hybridisierungspuffer wurden je 600/150/37,5/9,375 ng Bi-mRNA pipettiert (Verdünnung in TE). Anschließend wurden je 4 µl DIG markierte DNA Probe zupipettiert. Nach 3 Stunden Hybridisierung bei 50°C und 400 rpm wurden je 100 µl in eine auf 50°C vorgeheizte tRNA-SA Platte pipettiert und die gemäß Beispiel 3 erhaltene RNA 5 min bei 400 rpm gebunden. Anschließend wurde dekantiert und 5 x mit 0,1 % SSC gewaschen. Einpipettieren von je 100 µl DIGPOD Konjugat (25 mU/ml) und 30 min Inkubation bei 400 rpm und 37°C. Anschließend wurde dekantiert und 3 x 0,1 SSC gewaschen. Einpipettieren von je 150 µl Luminol/Iodphenol und Messung nach 3 min.

Tabelle 1

Bi-mRNA [ng/well]	Nicht Transfizierte Zellen		Transfizierte Zellen	
	Actin	CAT	Actin	CAT
600,0000	411368,0000	9254,0000	301705,0000	86979,0000
150,0000	332754,0000	8991,0000	120236,0000	39765,0000
37,5000	128350,0000	9052,0000	54657,0000	19252,0000
9,37502,	56151,0000	9001,0000	32221,0000	12011,0000
2,3440	38877,0000	8757,0000	26047,0000	8331,0000

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung einer spezifischen Polynukleotidsequenz in einer Probe, welches folgende Stufen umfaßt:

a) Isolierung der Nukleinsäuren und gegebenenfalls Überführung in einzelsträngige Nukleinsäuren;

b) Markierung der zu bestimmenden einzelsträngigen Nukleinsäure mit einer ersten chemischen, über eine Linkerfunktion gebundenen Gruppe;

c) Hybridisierung der markierten Nukleinsäure mit einer Polynukleotid-Sonde, die mindestens eine einzelsträngige Basensequenz umfaßt, die im wesentlichen komplementär zu der zu bestimmenden Sequenz und mit einer zweiten oder gegebenenfalls weiteren, von der ersten unterschiedlichen chemischen Gruppe markiert ist, in Lösung unter Bedingungen, die für eine Hybridisierung zwischen der zu bestimmenden Sequenz und der komplementären Sondensequenz günstig sind;

d) Immobilisierung des Nukleinsäure-Hybrids an eine Festphase über die erste chemische Gruppe und

e) Detektion der anderen chemischen Gruppe(n).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß mRNA isoliert wird und es sich bei der Polynukleotid-Sonde um ein Oligodesoxyribonukleotid, eine DNS, ein Oligoribonukleotid oder eine RNS handelt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Markierung der Nukleinsäure verwendete erste oder zweite chemische Gruppe ausgewählt werden aus einer enzymatisch aktiven Gruppe, einer fluoreszierenden Gruppe, einem Chromophor, einer lumineszierenden Gruppe, einem spezifisch bindbaren Liganden oder einem Radioisotop.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die erste über eine Linkerfunktion gebundene chemische Gruppe Biotin oder ein Biotinderivat darstellt.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Peroxidase,  $\beta$ -Galactosidase, Fluoreszein oder Digoxigen als zweite chemische Gruppe verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 3, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung mit einem aktivierten Platinkomplex durchgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erste oder zweite chemische Gruppe auf chemischem oder enzymatischem Weg in die Nukleinsäure eingeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Markierung mit einer terminalen Transferase oder einer T4 RNA-Ligase und einem durch eine chemische Gruppe markierten Nukleotids oder Oligonukleotid durchgeführt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich bei der markierten, komplementären Polynukleotid-Sonde um ein Peptid-Nukleinsäure-Derivat handelt.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine beschichtete Festphase verwendet wird.

11. Verfahren nach Anspruch 1 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphase mit Avidin, Streptavidin oder einem entsprechenden Derivat beschichtet ist und die Hybridisierung unter stringenden Bedingungen bei ca. 50°C vorgenommen wird.

12. Verfahren zur quantitativen Bestimmung einer spezifischen Polynukleotidsequenz in einer Probe, welches folgende Stufen umfaßt:

a) Isolierung der Nukleinsäuren und Überführung in einzelsträngige Nukleinsäuren;

b) Auswahl einer Polynukleotid-Sonde, die mindestens eine einzelsträngige Basensequenz umfaßt, die im wesentlichen komplementär zu der zu bestimmenden Sequenz ist;

c) Markierung der Nukleinsäure aus Schritt a) oder des Polynukleotids aus Schritt b) mit einer immobilisierbaren chemischen Gruppe, wobei es sich um über einen Platinkomplex gebundenes Biotin bzw. Biotinderivat handelt;

d) Hybridisierung der Nukleinsäure und des Polynukleotids in Lösung unter Bedingungen, die für eine Hybridisierung zwischen der zu bestimmenden Sequenz und der komplementären Sondensequenz günstig sind;

e) Immobilisierung des Nukleinsäure-Hybrids an eine Festphase über die immobilisierbare chemische Gruppe und

f) Detektion des Hybrids durch einen Antikörper, der spezifisch an DNA/RNA- oder RNA/DNA-Duplexe bindet und durch eine bestimmbare chemische Gruppe markiert ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der isolierten Nukleinsäure um solche mit Poly-dA-Sequenzen handelt.

Abb. 1

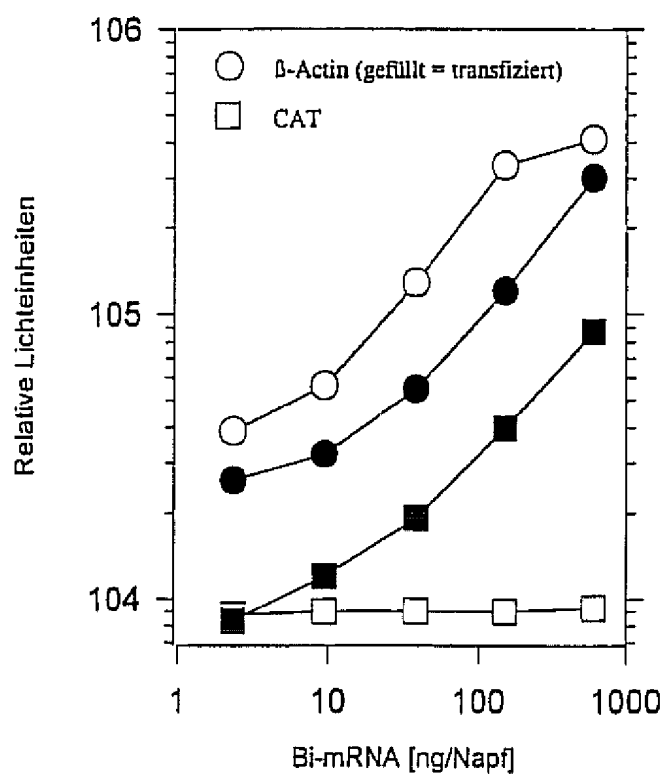




Abb. 2

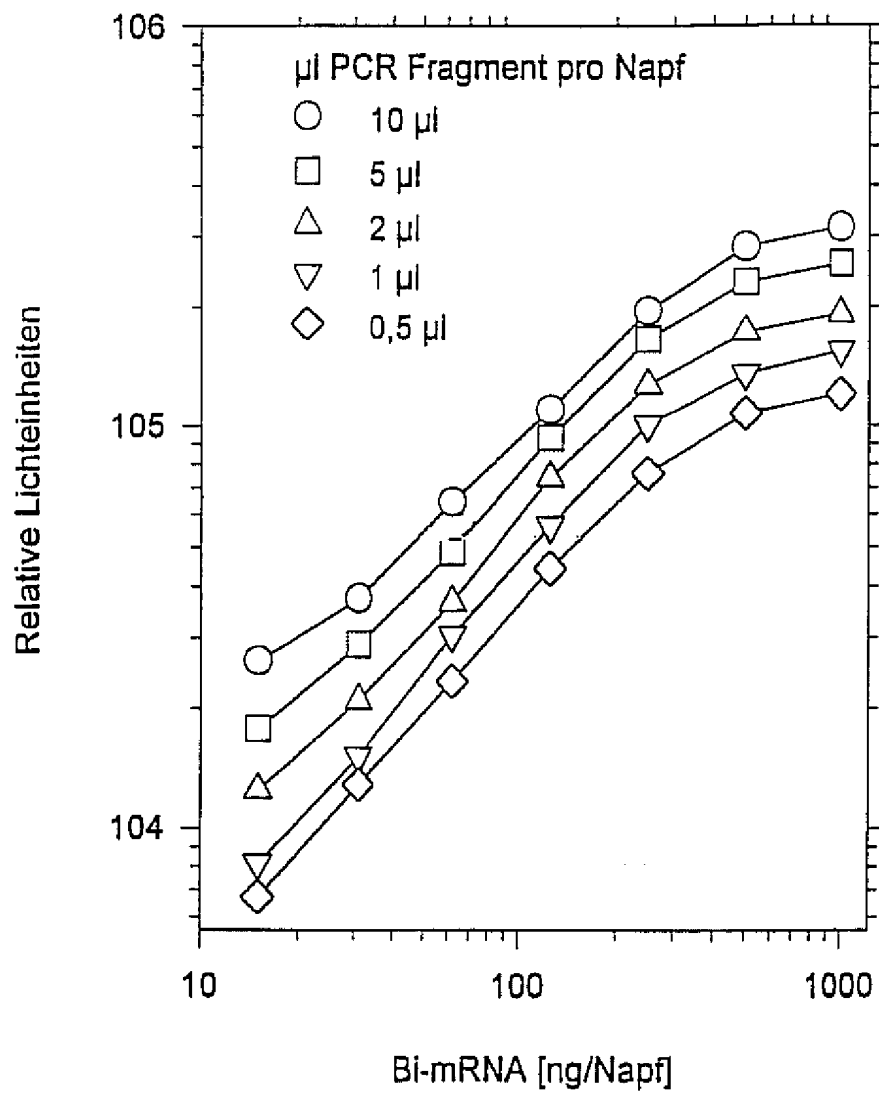


Abb. 3

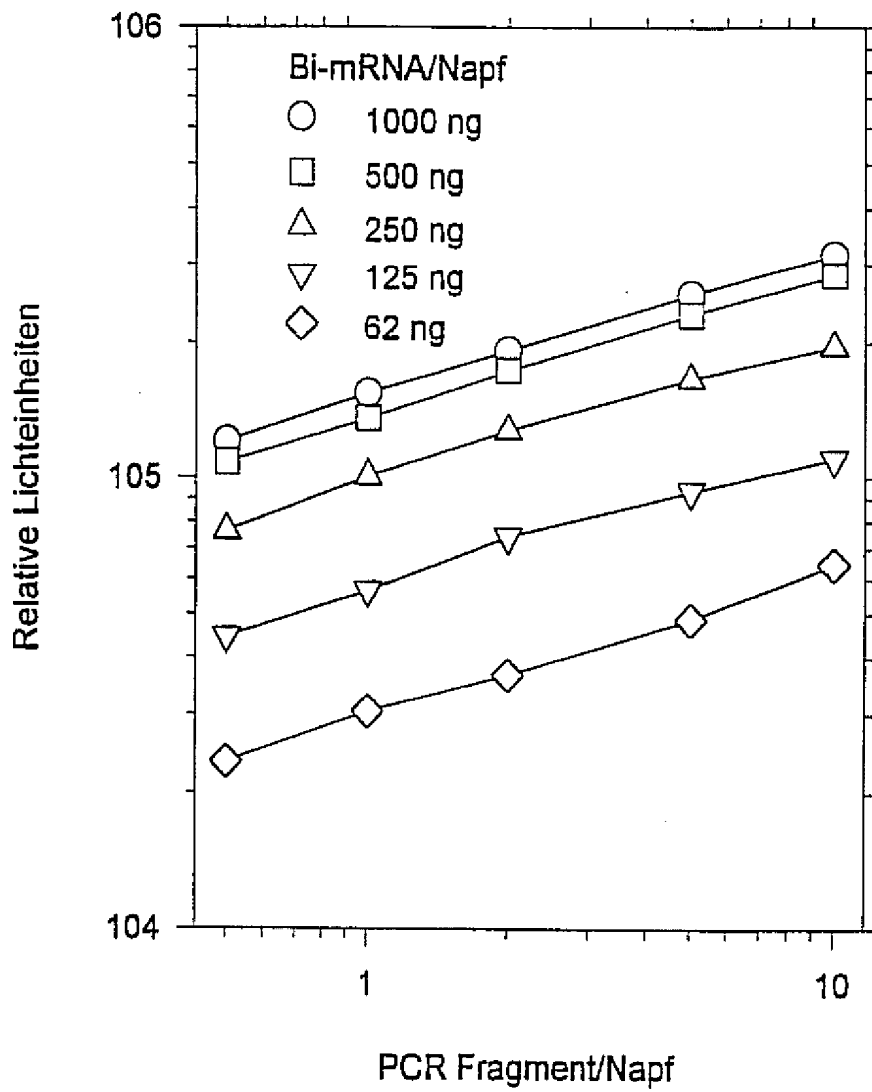


Abb. 4

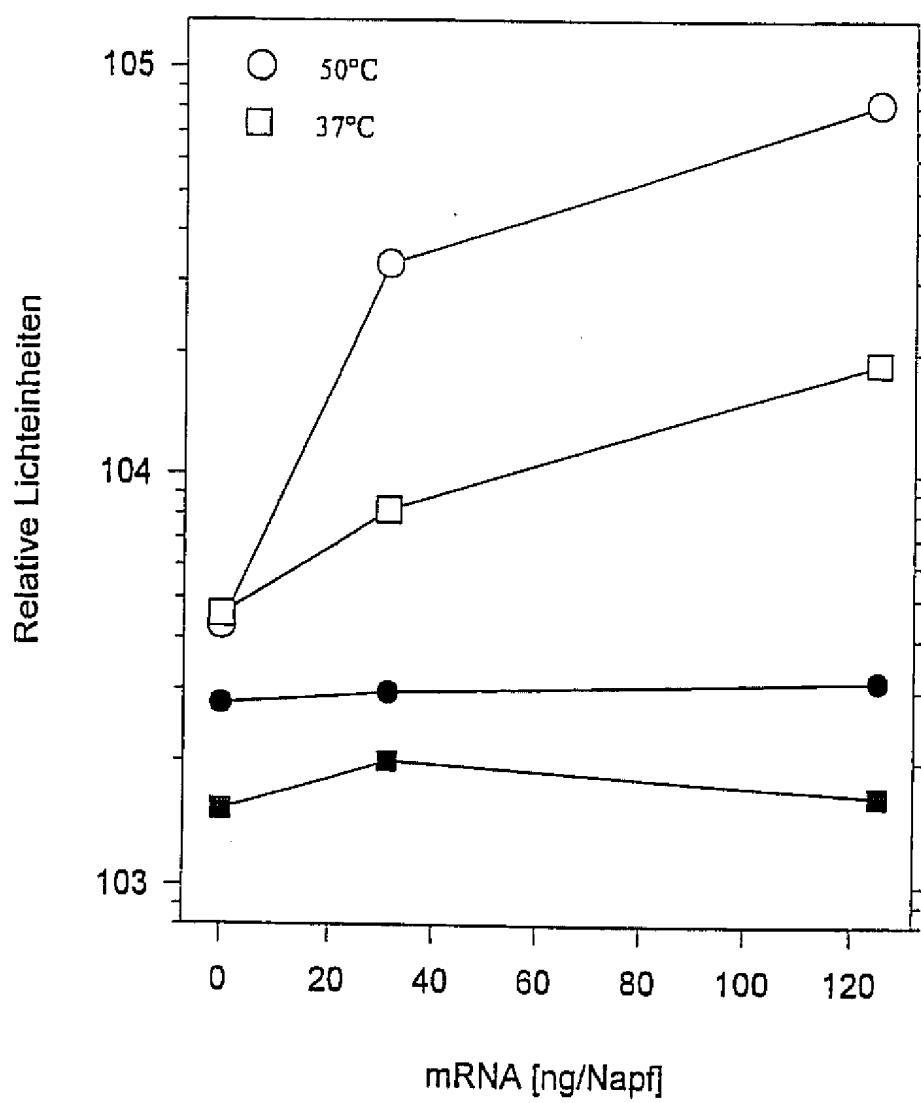


Abb. 5

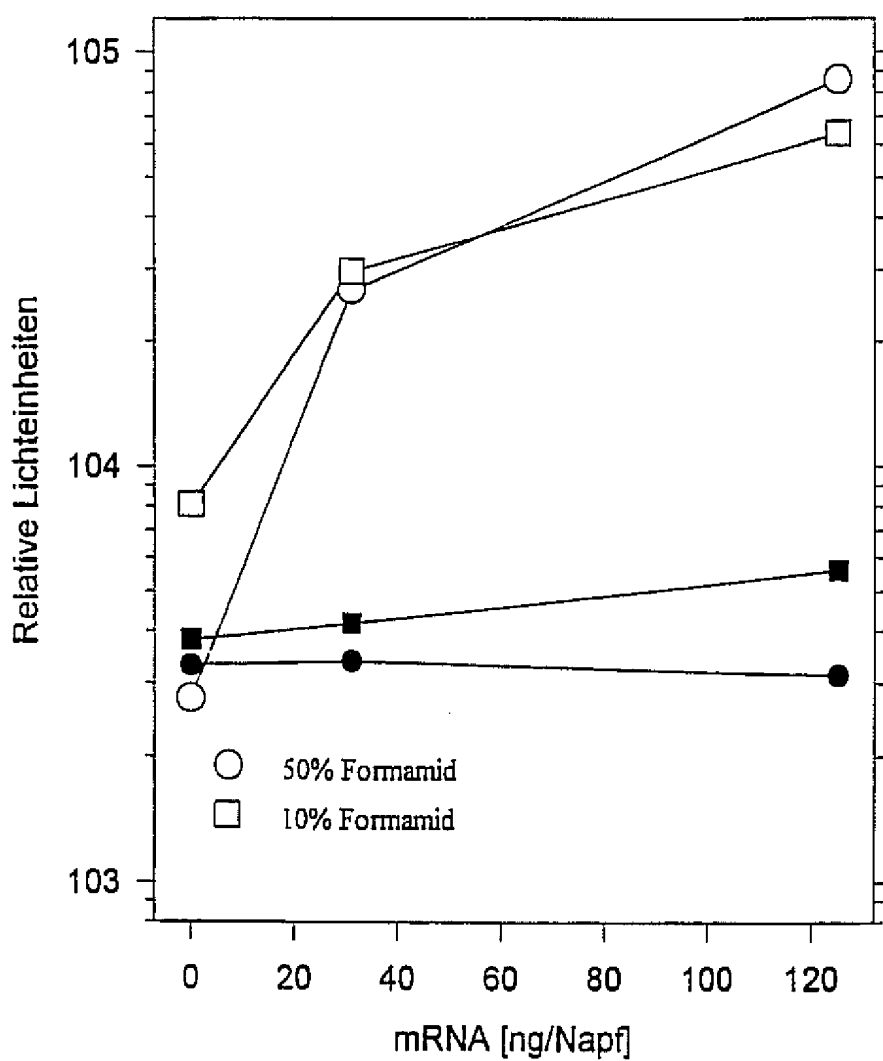


Abb. 6

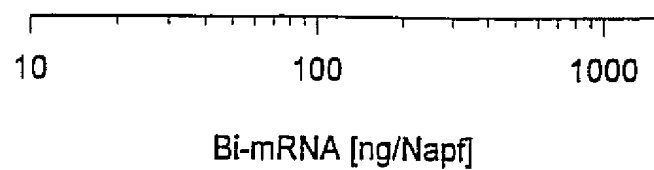
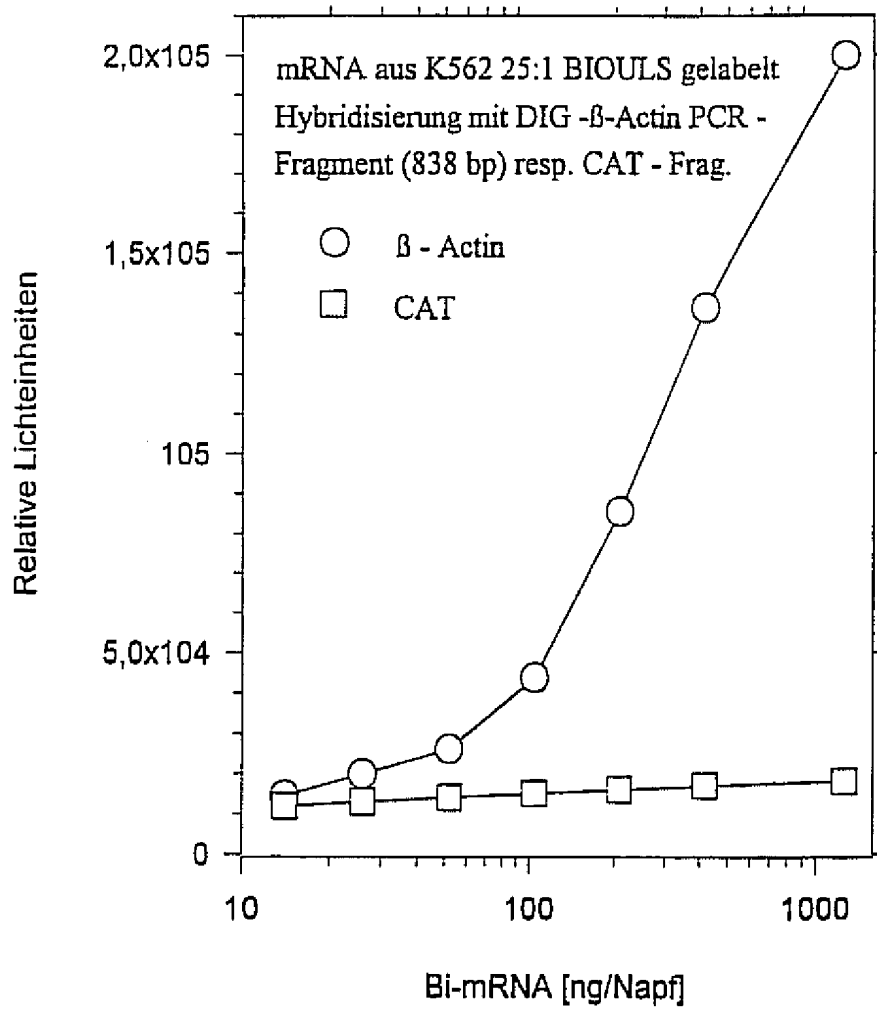
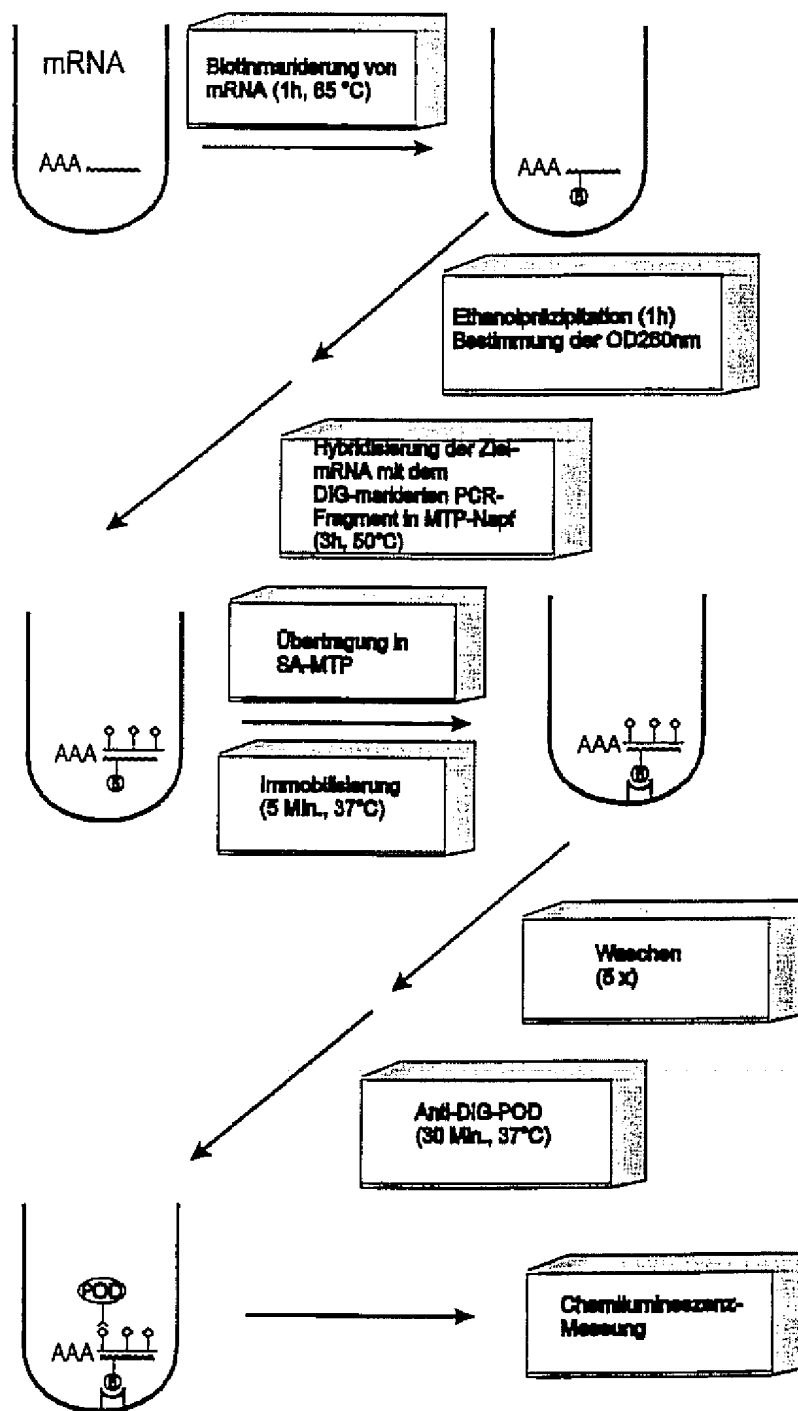










Abb. 7



**Quantitative detection of nucleic acids****Publication number:** EP0742286**Publication date:** 1996-11-13**Inventor:** DOPPLER CLEMENS DR (DE); FRITTON HANS-PETER DR (DE); HINZPETER MATTHIAS DR (DE); LEYING HERMANN DR (DE); WITTOR HEIKO (DE)**Applicant:** BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)**Classification:****- international:** C12N15/09; C12Q1/04; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/04; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68**- European:** C12Q1/68B**Application number:** EP19960107141 19960507**Priority number(s):** DE19951016196 19950508**Also published as:** JP9098799 (A)  
 EP0742286 (A3)  
 DE19516196 (A1)**Cited documents:** EP0237833  
 EP0539466  
 EP0523557  
 EP0324468  
 XP001002148[Report a data error here](#)**Abstract of EP0742286**

Quantitative assay for a target nucleic acid sequence in a sample comprises: (1) (i) isolating nucleic acids from the sample and, if necessary, converting them into single-stranded form, (ii) labelling the target sequence with an anchor gp. via a linker; (iii) hybridising the labelled nucleic acid in soln. with a labelled probe that is complementary to the target sequence, (iv) immobilising the resulting duplex on a solid phase through the anchor gp. and detecting the label, or (2) (i') isolating nucleic acids from the sample and converting them into single-stranded form, (ii') selecting a probe that is complementary to the target sequence, (iii') labelling the target sequence or the probe with an anchor gp., namely biotin or a biotin deriv. linked via a Pt complex, (iv') hybridising the target sequence with the probe in soln., (v') immobilising the resulting duplex on a solid phase through the anchor gp. and (vi') detecting hybridisation using a labelled antibody that binds specifically to DNA/RNA or RNA/DNA duplexes.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



Europäisches  
Patentamt  
European Patent  
Office  
Office européen  
des brevets

Description of EP0742286

Print

Copy

Contact Us

Close

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; It is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

The invention describes a method to the quantitative determination of specific Polynukleotid sequences, which is essentially characterized by the fact that one from a mixture, like e.g. a biological sample isolated einzelsträngige nucleic acid, in particular mRNA, in solution with one essentially the sequence complementary Polynukleotid sequence hybridized, subsequent to a solid phase, which can be determined, immobilized and the amount at bound hybrid certain becomes. As particularly suitable proved, if the connection to the coated solid phase by means of a specific bindable chemical group coupled to the sequence which can be determined or the Polynukleotid probesequence made.

A number of methods to the proof of nucleic acids are today known. These are usually based on the principle of the hybridization, whereby in most cases first the immobilization of the sequence which can be determined becomes to the solid phase made and a subsequent labeled nucleic acid sample added. The method is to be accomplished however time-consuming and for the untrained practitioner not so easily with success. This applies in particular therefore, since an hybridization at the solid phase runs a little efficiently.

Alternative one can be made the determination from nucleic acids over in situ-mark the sample nucleic acid and the fixation to the solid phase, mediated by a sequence-specific nucleotide sequence sample. In an other method two sequence-specific Probes for the nucleic acid which can be determined are consulted. Both in situ-mark, and the hybridization with two Probes at the solid phase often do not run more reproducible, i.e. are more severe or only with large inaccuracy quantifiable, little suitable in addition experimental expensive is and thus for the routine of the clinical diagnostic. Corresponding methods and/or. Variants are known as Northern blot methods, Nuclease Protection Assay and quantitative blank PCR methods and belong today to the standard methods to the quantitation of nucleic acids (T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory manual, 2nd OD. (1989); R. E. Farrell, RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization, Academic press; J. W. Larrick, trend Biotechnol. 10, 146-152 (1992); E. S. Kawasaki, A Guide ton of Methods and Applications (eds. Innis, M.A. et al.) Academic press).

In addition the proof of nucleic acids, in particular from mRNA in the so called micro titer disk method known, is whereby the hybridizing reaction in solution made. Usually made thereby the hybridization with a Biotin labeled cDNA-sample. The nucleic acid-hybrid subsequent over the Biotin marking immobilized becomes and with an antibody, which binds specific DNA/RNA hybrid in a conventional ELISA method detected (C. O. Yehle et al., mol. Cell. Probes 1, 177-193 (1987); F. Countlee et al., J. Biol. Chem. one. 256, 11601-11604 (1990); EP 0,336,454). Furthermore it is possible detection sample suitable instead of an antibody to use (suctions. Sand yielding hybridizing, EP 0,192,168).

▲ top

Adverse with methods this type is however to the one that only DNA can become used as catch sample under the fact that the proof over DNA/RNA specific antibody made. On the other hand the system is only little sensitive using conventional chromogenic substrates. Beyond that shown has itself with the use of photo-reactive substances as marking reagent for Nukleinsäureprobes that the sensitivity is insufficient and the handling of corresponding determination methods leaves to wish remaining (EP 0,237,833).

Also a only recent published method, with which RNA first with one already in micro-titer-diskwave immobilized catch sample hybridized and subsequent with a fluorescent interkallierendem Agenz labeled and one detects (T. Okamoto et al., anal ones. Biochem. 221, 202-204 (1994)), overcomes the disadvantages only partially. In dependence of the length of the catch sample this method leads to high background signals, since not only the actual RNA which can be proven, but also the immobilized catch sample become labeled.

Object of the underlying invention is to place a method to determination of a specific polynucleotide sequence to the order by which the disadvantages are overcome in the conditions of the technique described methods, i.e. light in particular feasible and automizable is and with that nucleic acids quantitative detected to become to be able.

Dissolved one becomes the object by a method the determination of a specific polynucleotide sequence in a sample mixture, which covers subsequent steps: The nucleic acids, in particular such with Poly there sequences (mRNA) become isolated and, so far still required, transferred into einzelsträngige nucleic acids.



Subsequent one the made mark of the einzelsträngigen nucleic acid with a chemical group, those preferably over a left function to the nucleic acid molecule, which can be determined, favourable-proves in non-covalent bound is and/or. associated is. When chemical groups are such suitable, becomes mediated by which either the connection to the solid phase, or which in a direct or indirect method are more detectable. As immobilized chemical groups specific bindable ligands have themselves like e.g. Biotin or haptens like e.g. Digoxigenin as favourable proved.

The labeled nucleic acid becomes then with a Polynukleotid probe, which covers at least a einzelsträngige base sequence, which is essentially more complementary to the sequence which can be determined, in solution bottom conditions, which are favorable for an hybridization between the sequence which can be determined and the complementary probe sequence, hybridized. The probe sequence is with a second, from the first different chemical group labeled. Here it comes in principle like immobilized above or assignable chemical groups into considerations under the condition that the first and second group identical may not be.

The dual labeled nucleic acid hybrid becomes bound over a group of markings to the solid phase, and over the other one the amount becomes quantified to bound hybrid and thus the nucleic acid isolated from a certain volume.

In particular as favourable the invention process for the quantitation of Poly there sequences proved containing nucleic acids as mRNA. The hybridization all types of samples used can become, in particular anti-scythe RNA and so called "peptides Nucleic Acid" (PNA). This is of importance, since more efficiently made than between hybridizes the hybridization between PNA and RNA molecules pure RNA molecules and this again more efficiently than DNA and RNA molecules.

The incorporation of a large number of marks into the RNA which can be proven or into to the proof used the DNAs an allowed increase of the measurement signal and thus in particular also the chromogenic proof of more specific mRNA, what with the previously known methods only conditional possible is.

An other advantage of the invention process consists of the fact that the sample used to the immobilization does not become labeled. This leads to a significant reduction of the background.

Besides it is with the invention process from advantage that the hybridizing reaction not at the solid phase, but in solution made. Hybridizations in solution take place more efficiently and significant more rapid.

Beside the chemical groups for the mark, already stated, are besides, as assignable groups, enzymatic active groups as for example peroxidase or beta - galactosidase, fluorescent groups such as fluorescein or corresponding derivatives, Chromophore of most diverse type or luminescent groups suitable. These chemical groups can become on chemical or enzymatic pathway into the nucleic acid incorporated. In addition, radioisotopes, for example incorporated in presence of a terminal transferase and/or, T4 RNA ligase and a corresponding labeled nucleotide and/or. Oligonucleotide, as suitable proved.

In addition a method can to the insertion of non-radioactive labeled Desoxynukleotiden in nucleic acids and/or. RNA molecules, which at their 3' - end at least a Desoxynukleotid, which carries a non-radioactive group of markings, used become contained. A corresponding method is in the European patent application, file reference 95,102 669,9, described.

As particularly favourable proved, if the mark of the nucleic acid and/or. the Polynukleotids with a corresponding hapten, as for example biotin or a digoxigenin, a platinum-contained komplexiert compound, as for example {Pt (ethyl diamine) into (Me2SO) (hapten NH (CS) NHCH3)}, performed becomes. For the mark a corresponding activated form of such platinum complexes becomes used. Such platinum compounds proved as left function as special suitable and become Linkage system" (ULS) referred (EP 0,539,466/WHERE 92/01699) usually universal as ". As detectable, i.e. as the second chemical group in particular platinum complex proved coupled groups as favourable.

An other preferable embodiment of the invention is, if becomes essentially used instead of a labeled, complementary Polynukleotid probe a Peptid nucleic acid derivative with base sequence complementary to the determining sequence.

The solid phase can consist in principle of series of materials and forms, like e.g. Microparticle, so called Beads, porenhaltige or non-permeable membranes, the inner surfaces of reaction vessels such as test tubes or microtiter plates. Preferred one becomes the instant invention at coated microtiter plates (e.g. Nunclon) performed, in particular such, became made with which the coating with streptavidin (SA) or avidin. Corresponding measures and/or. Solid phases are the person skilled in the art known and for example in EP 0344578 described.

In the following the single process steps of the invention process become precise described:

The isolation of approx. 10 - 20 µg mRNA made over suitable Beads the corresponding informations to the mRNA Isolierungskit of Boehringer Mannheim. The quantitation made with OD260/280nm, whereby 2 µg correspond mRNA in 500 µl to aqueous solution 0.1 OD260nm.

▲ top

For the mark of approx. 10 µg mRNA become approx. 0,4 µg Biotin ULS added and approx. 60 minutes with 65 DEG C, subsequent with ethanol filled and over OD260/280nm quantified inkubiert.

For the hybridization become approx. 100-150 µl/well in a suitable hybridizing buffer presented and on approx. 50 DEG C preheated. A DIG labeled DNA sample becomes given in denatured form the respective reaction, after approx. 50 to 1000 ng/well the Biotin labeled mRNA was in-pipetted. When particularly favourable hybridizing buffer has itself for example an aqueous solution proven, those approx. 50% formamide, 0.1% Laurylsarcosin and 0.02% SDS contain. The hybridization made usually between 30 minutes to 4 hours - the duration of the hybridization e.g. hangs. of the length of the specific sample sequence and of the stringency of the hybridization conditions off with approx. 50 DEG C with 400 RPM. These hybridization conditions proved surprisingly for the specific proof of RNA as good suitable. This is therefore surprising, since ensured on side becomes the required stringency, on the other side however a rapid denaturation of protein, like e.g. a proteinaceous coating to expect would have been.

From the hybridizing beginning become approx. ever Mikrotiterplatten wells pipettes 100 µl into SA-coated pre-heated on 50 DEG C. The incubation made with 50 DEG C/400 RPM in approx. 5 minutes.

Subsequent one is decanted and 3 to 6 times with room temperature washed. The subsequent incubation with for example POD labeled  $\lambda$  DIG antibody made in 30 minutes with 37 DEG C and 400 RPM. The subsequent detection made for example by a pipetting of Luminol/Iodphenol and measurement after approximately. 3 minutes.

Explanations to the Images:

Image 1: The result of example 1-4 shows, whereby  $\beta$ -actin, a gene, which permanent in cells occurs, and CAT, a gene, which does not occur in eukaryotic cells meant; "transfected" means filled symbols.

Image 2: Shows the influence of the Ampliconkonzentration, whereby  $\beta$ -actin = 0.5 µl, CAT = 1 µl, INCREMENT = 2 µl, NABLA = 5 µl and  $\lambda$  = 10 µl PCR fragment per wave mean.

Image 3: Shows the influence of the Ampliconkonzentration with constant RNA concentration ( $\beta$ -actin = 1000 ng, CAT = 500 ng, INCREMENT = 250 ng, NABLA = 125 ng and  $\lambda$  = 62 ng biotin (BI) - mRNA/wave).

Image 4: Shows the influence of the Hybridisierungstemperatur,  $\beta$ -actin = 50 DEG C and CAT = 37 DEG C.

Image 5:  $\beta$ -actin = 50% formamide shows the influence of the formamide concentration and CAT = 10% formamide.

Image 6: Shows a comparison between the Northern according to Invention ELISA and the Northern Blot method to the state of the art, whereby mRNA from 1 x 562 25:1 BioULS are gelabelt and the hybridization with DIG  $\beta$ -actin PCR fragment (838 BP) and/or. CAT fragment performed became;  $\beta$ -actin =  $\beta$ -actin, CAT = CAT.

Image 7: Reaction pattern of the invention process (Northern ELISA).

The subsequent examples continue to describe the invention:

Entire one mRNA becomes labeled over Biotin platinum complexes (bio ULS TM) with biotin. The approach becomes subsequent with one for a Transkript specific, digoxigenin (DIG) gelabelten DNA/RNA sample hybridized. After connection mRNAs in streptavidin (SA) - coated microtiter plate MTP is detected the specific RNA over  $\lambda$  DIG antibody.

In this report the measurement of Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) becomes - specific mRNA out cells transfected with CAT plasmid described.

#### Material and methods

▲ top

Plasmid pSV2CAT became obtained of Dr. Kösters (university University of Zurich). DNAs DIPSTICKS TM to the quantitation mRNA come from Invitrogen one (the USA). Bio ULS TM comes from Kreatech (Holland). Reagents such as Northern hybridizing buffer (50% formamide, 5 x SSC, 12% Blocking reagent in maleic acid buffer, 0.1% Laurylsarcosin, 0.02% SDS), mRNA isolation kits, cell culture mediums and Transfektionsreagenzien, reagents to the production of the DNAs Probes, streptavidin coated MTP,  $\lambda$  DIG antibody, RNase free Konjugatverdünnungspuffer (40 mM KPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0.25% RSA, pH 6.8) Luminol/Iodphenol as chemistry luminescence practicing advice and other reagents come from Boehringer Mannheim. Chemistry luminescence measurements became with the Microplate luminometers of LP 96P von Berthold performed.

#### Example 1

##### Production of the DIG Probes gelabelten

Methods to the production of suitable Probes are for the example amplification over PCR, random Primed Labeling and In vitro transcription. The here used Probes became amplified over suitable primers, which lay within the coding sequence of the target RNA, by means of PCR. Sample length for act in sample: 838 BP; for CAT sample: 367 BP (molar ratio in PCR mixing: dUTP/DIG dUTP = 3/1). Over Ethidiumbromidfärbung the Ampliconkonzentration became estimated and with triethanolamine (width unit) pH 8,0 on approx. 20ng/µl adjusted.

#### Example 2

## Transfektionsansatz

HeLa cell became transfected by means of DOTAP after enclosing note with pSV2CAT. From the transfected cells and the untreated controls became mRNA by means of magnetic beads isolated.

5 culture bottles with for each  $5 \times 10^6$  Cells/bottles (50 ml KM) became with altogether 400  $\mu$ g plasmid during 6 hours transfected. 24 hours after the transfection were abtropsiniert the cells, with PBS washed and the pellet in liquid nitrogen stored ( $4,4 \times 10^6$  living cells, 80% dead cells). Analogous ones one proceeded with the not transfected control ( $1,3 \times 10^6$  living cells, 5% dead cells).

## Example 3

## mRNA Isolation and mark with biotin

mRNA purified and the concentration over DNA became DIPSTICK the TM certain by means of magnet beads according to enclosing note: HeLa (+CAT): 10  $\mu$ l with  $c=360$  ng/ $\mu$ l, HeLa (-CAT): 23  $\mu$ l with  $c=500$  ng/ $\mu$ l. Then with Biotin ULS in the ratio RNA/Bio ULS = 20/1 (W/W) 1 hour was gelabelt with 65 DEG C, aufgreinigt over ethanol precipitation and resupendiert in waters. Subsequent concentration regulation over DNA DIPSTICKS TM resulted in: HeLa (+CAT): 9  $\mu$ l with 200 ng/ $\mu$ l, HeLa (-CAT): 29  $\mu$ l with 80 ng/ $\mu$ l.

## Example 4

## Execution Northern ELISA

Into a cell culture round base plate 120 each was pipetted  $\mu$ l Northern hybridizing buffer and on 50 DEG C heated. The DIG labeled Probes from example 1 became 5 min with 100 DEG C denatured and then in the ice bath cooled. To the hybridizing buffer 600/150/37.5/9.375 each were pipetted ng Bi-mRNA (dilution in width unit). Subsequent ones 4 were zupipettiert each  $\mu$ l DIG labeled DNAs sample. After 3 hours hybridization with 50 DEG C and 400 RPM were pipetted per 100  $\mu$ l into a trsa SA plate pre-heated on 50 DEG C and the RNA 5 min obtained in accordance with example 3 with 400 RPM bound. Subsequent one was decanted and 5 x with 0,1% SSC washed. A-pipette from ever 100  $\mu$ l &lang&DIG&rang&POD Konjugat (25 mU/ml) and 30 min incubation with 400 RPM and 37 DEG C. Subsequent one was decanted and 3 x 0.1 SSC washed. A-pipette from 150 each  $\mu$ l LumInol/Iodphenol and measurement after 3 min.

< tb> < TABLE> Id=Tabelle 1 Columns=5

< tb>

< tb> Head Col 1: Bi-mRNA [ng/well]

< tb> Head Col 2 tons of 3 AL=L: Not transfected cells

< tb> Head Col 4 tons of 5 AL=L: Transfected cells

< tb>

< tb> SubHead Col 1:

< tb> SubHead Col 2: Actin

< tb> SubHead Col 3: CAT

< tb> SubHead Col 4: Actin

< tb> SubHead Col 5: CAT

< tb> 600,0000< SEP> 411368,0000< SEP> 9254,0000< SEP> 301705,0000< SEP> 86979,0000

< tb> 150,0000< SEP> 332754,0000< SEP> 8991,0000< SEP> 120236,0000< SEP> 39765,0000

< tb> 37,5000< SEP> 128350,0000< SEP> 9052,0000< SEP> 54657,0000< SEP> 19252,0000

< tb> 9,37502, < SEP> 56151,0000< SEP> 9001,0000< SEP> 32221,0000< SEP> 12011,0000

< tb> 2,3440< SEP> 38877,0000< SEP> 8757,0000< SEP> 26047,0000< SEP> 8331,0000

< tb> < /TABLE>

▲ top



Europäisches  
Patentamt  
European Patent  
Office  
Office européen  
des brevets

[Claims of EP0742286](#)
[Print](#)
[Copy](#)
[Contact Us](#)
[Close](#)

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; It is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet@ Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

1. Method to the quantitative determination of a specific polynucleotide sequence in a sample, the which covers subsequent steps:

- a) Isolation of the nucleic acids and if necessary transfer into einzelsträngige nucleic acids;
- b) Mark of the einzelsträngigen nucleic acid with a first chemical group, bound which can be determined, over a left function;
- c) Hybridization of of the labeled nucleic acid with a Polynukleotid probe, which covers at least a einzelsträngige base sequence, which essentially more complementary to the one which can be determined the sequence and with second or if necessary other, from which first different chemical group labeled is, conditions bottom in solution, which are favorable for an hybridization between the sequence which can be determined and the complementary probe sequence;
- d) Immobilization of the nucleic acid Hybrids to a solid phase over the first chemical group and
- e) Detection of the other chemical group (n).

2. Process according to claim 1, that mRNA isolated characterized thus becomes and it concerns with the Polynukleotid probe a Oligodesoxyribonukleotid, a DNS, a Oligoribonukleotid or a RNS.

3. Process according to claim 1, characterised in that the first or second chemical group selected used for the mark of the nucleic acid becomes from an enzymatic active group, a fluorescent group, a Chromophor, a luminescent group, a specific bindable ligand or a radiolotope.

4. Process according to one of claims 1 or 3, characterised in that the first chemical group biotin or a Biotinderivat bound over a left function represents.

5. Verfahren according to claim 1 or 3, characterised in that a peroxidase, beta - galactosidase, fluorescein or Digoxigen as the second chemical group used become.

6. Process according to one of claims 1, 3, 4 or 5, characterised in that the mark with an activated platinum complex performed becomes.

▲ top

7. Process according to claim 1, characterised in that the first or second chemical group on chemical or enzymatic pathway into the nucleic acid introduced becomes.

8. Process according to claim 7, characterised in that the enzymatic mark with a terminal transferase or a T4 RNA ligase and by a chemical group of labeled nucleotide or Oligonukleotid a performed becomes.

9. Verfahren according to claim 1, characterised in that with the labeled, complementary Polynukleotid probe around a Peptid nucleic acidderivative acts.

10. Process according to claim 1, characterised in that a coated solid phase used becomes.

11. Process according to claim 1 or 10, characterised in that the solid phase with avidin, streptavidin or a corresponding derivative coated is and the hybridization more bottom stringer-ends operations with approx. 50 DEG C made becomes.

12. Verfahren to the quantitative determination of a specific polynucleotide sequence in a sample, the which covers subsequent steps:

- a) Isolation of the nucleic acids and transfer into einzelsträngige nucleic acids;
- b) Selection of a Polynukleotid probe, which covers at least a einzelsträngige base sequence, which is essentially

more complementary to the sequence which can be determined;

c) Mark of the nucleic acid from step A) or the Polynukleotids from step b) with a immobilized chemical group, whereby it itself over over a platinum complex bound biotin and/or. Biotinderivat acts;

d) Hybridization of the nucleic acid and the Polynukleotids in solution bottom conditions, which are favorable for an hybridization between the sequence which can be determined and the complementary probe sequence;

e) Immobilization of the nucleic acid Hybrids to a solid phase over the immobilized chemical group and

f) Detection of the Hybrids by an antibody, which binds specific to DNA/RNA or RNA/DNA duplexes and by an assignable chemical group labeled is.

13. Process according to claim 11, characterised in that it with the isolated nucleic acid around such with Poly there sequences acts.

▲ top